

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2004254631
PUBLICATION DATE : 16-09-04

APPLICATION DATE : 27-02-03
APPLICATION NUMBER : 2003050698

APPLICANT : FUJI OIL CO LTD;

INVENTOR : SUGANO HIDEO;

INT.CL. : A23J 3/16

TITLE : METHOD OF PRODUCING SEPARATED SOYBEAN PROTEIN

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of producing a separated soybean protein improved in environmental loading and having high protein yielding.

SOLUTION: This method of producing the separated soybean protein comprises making transglutaminase act on a nonfat soy milk and separating the product into whey and curd under acidity.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO&NCIPI

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-254631

(P2004-254631A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.Cl.⁷

A23J 3/16

F1

A23J 3/16 502

テーマコード(参考)

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2003-50698 (P2003-50698)
(22) 出願日 平成15年2月27日(2003.2.27)

(71) 出願人 000236768
不二製油株式会社
大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号
(72) 発明者 加藤 裕之
大阪府泉佐野市住吉町1番地不二製油株式会社阪南事業所内
(72) 発明者 菅野 秀夫
大阪府泉佐野市住吉町1番地不二製油株式会社阪南事業所内

(54) 【発明の名称】 分離大豆蛋白の製造法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、環境負荷が改善され、蛋白収量が高い分離大豆蛋白の製造法を目的とする。

【解決手段】本発明は、脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを作用させ、酸性下にホエーとカードに分離することを特徴とする分離大豆蛋白の製造法である。

【選択図】なし。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを作用させ、酸性下にホエーとカードに分離することを特徴とする分離大豆蛋白の製造法。

【請求項2】

脱脂豆乳の粗蛋白質1gあたりのトランスグルタミナーゼ量が0.05以上1.0ユニット未満である請求項1の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、環境負荷が改善され、蛋白収量が高い分離大豆蛋白の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

通常、分離大豆蛋白は、低変性脱脂大豆に水を加えて懸濁液（スラリー）状となし、水不溶性成分であるおからを除去して脱脂豆乳を得て、この脱脂豆乳に酸を加えて大豆蛋白を沈殿させ上澄みであるホエーを除去し、加水して中和し乾燥して粉末状分離大豆蛋白とする方法が採用されている。しかしホエーは臭味がよくなく産業的な利用性が低いため、ホエーの中に溶解している蛋白を高価な分離蛋白の一部として回収する検討は殆どなされていなかった。このため、ホエーを排水として処理するコストが高くつくという問題があった。

【0003】

また大豆蛋白はおからと脱脂豆乳の分離の際におからにも残存するので最終分離大豆蛋白の収率をあげるにはおからの蛋白を効率よく抽出することが主に研究されてきた。しかし、技術的にはほぼ限界に達しており、現在の技術水準では、工業的に分離大豆蛋白の収率が1%程度でもアップすれば経済的にも生産性寄与は大きなものがある。

【0004】

一方、トランスグルタミナーゼを利用して食用蛋白を架橋改質するなどの方法が知られている。この酵素は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の α -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このトランスグルタミナーゼは、アシル受容体としてのタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基に作用し、タンパク質分子の分子内において及び分子間において $\epsilon-(\gamma\text{-Glu})\text{-Lys}$ 架橋結合を形成する。また、水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されてグルタミン酸残基になる反応を進行させる。トランスグルタミナーゼの大豆蛋白に対する態様に関しては、特許文献1や特許文献2にみられるように、トランスグルタミナーゼを使用して蛋白のゲル物性を改良し、これらのゲルにかたさや弾力性を付与してきた。そして、特許文献3や特許文献4のように、大豆蛋白とトランスグルタミナーゼを反応させる際、二価金属塩や異種蛋白を共存させることにより大豆蛋白の色調や風味・物性の改良を試みてきた。しかし、トランスグルタミナーゼを利用して分離大豆蛋白の収率を向上させる方法は知られていない。

【0005】

【特許文献1】特開昭58-149645号公報

【特許文献2】特開昭64-27471号公報

【特許文献3】特開平4-63548号公報

【特許文献4】特開平10-165106号公報

【特許文献5】特公平1-50382号公報

【特許文献6】特開平1-300889号公報

【非特許文献1】「昭和63年度日本水産学会秋期大会講演要旨集」：関信夫ら、167頁

【非特許文献2】「平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集」219頁

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

この発明は、環境負荷が改善され、蛋白収量が高い分離大豆蛋白の製造法を目的とする。本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ね、いろいろな酵素の中かからトランスグルタミナーゼに着目し、分離大豆蛋白の製造工程のいろいろな段階で該酵素を作用させて、その影響を研究するなかで、分離大豆蛋白の製造工程の特定の工程、即ち、脱脂大豆から調製した脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを作用させることにより上記課題を達成できることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明は、脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを作用させ、酸性下にホエーとカードに分離することを特徴とする分離大豆蛋白の製造法であり、最も好ましくは、脱脂豆乳の粗蛋白質1gあたりのトランスグルタミナーゼ量が0.1以上1.0ユニット未満であるのがよい。

【0008】

【発明の実施の形態】

脱脂豆乳の原料は、大豆から大豆油を圧搾、溶剤抽出した残りの低変性脱脂大豆を用いることができ、かかる脱脂豆乳の製法自体は公知の方法を採用することが出来る。脱脂大豆から水系下に脱脂豆乳を抽出する態様としては、脱脂大豆に水を加えて攪拌などしてスラリー状となし、遠心分離等しておからと脱脂豆乳を分離して脱脂豆乳を得ることが出来る。その他濾過などの固液分離手段を利用することも出来る。

【0009】

本発明において重要なことは、トランスグルタミナーゼの添加時期である。即ち、脱脂大豆から脱脂豆乳を調製した段階でトランスグルタミナーゼが添加されて存在することが肝要である。

【0010】

脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを添加する以外の工程では以下のように分離大豆蛋白の収率を上げる効果が見られない。例えば、脱脂大豆に水を加えてスラリー状とする段階でトランスグルタミナーゼを添加すると、該スラリーの粘度が上昇して脱脂豆乳とオカラの分離が困難になるだけでなく、該おからへ該脱脂豆乳が吸収され、脱脂豆乳の回収率がかえって悪くなる。この結果、該脱脂豆乳から分離大豆蛋白を製造しても原料脱脂大豆からの分離大豆蛋白の収率はかえって低下してしまう。

【0011】

また該スラリーの粘度上昇を抑えるために加水量を増やすことは可能であるが、それではホエーの水量が増大し、逆に環境悪化やコストアップにつながってしまう。排水量を増やさずにホエー中の蛋白量を低下させることは、排水処理負荷の低減もあってコスト効果に寄与する。

【0012】

また、脱脂豆乳を酸沈殿させて酸沈殿したカードと上澄みであるホエーに分離した後の工程にトランスグルタミナーゼを作用させても、もはや分離大豆蛋白の収率が上がることはない。

【0013】

トランスグルタミナーゼには、カルシウム非依存性のものとカルシウム依存性のものがある。前者の例としては微生物由来のもの（例えば、特許文献2参照）を挙げることができる。後者の例としてはモルモット肝臓由来のもの（特許文献5参照）、魚由来のもの（例えば、非特許文献1の167頁及び非特許文献2の219頁参照）を挙げることができる。この他、遺伝子組み替えにより製造されるもの（特許文献6参照）等、いずれのトランスグルタミナーゼでも用いることができ、起源及び製法に限定されることはない。但し、機能性及び経済性の点から、好ましくはカルシウム非依存性のものが適当であり、上述の微生物由来のトランスグルタミナーゼ（特許文献2）は、その例である。

【0014】

尚、本発明でいうトランスグルタミナーゼの活性単位は、次のようにして測定され、かつ定義される。即ち、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロル酢酸存在下で鉄錯体を形成させた後、525 nmの吸光度を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め、活性を算出する（特許文献2参照）。

【0015】

本発明において脱脂豆乳に添加するトランスグルタミナーゼの量は脱脂豆乳の粗蛋白質1gあたり0.01～100ユニット（U）という広範な範囲を使用しうるが、大量生産を行う分離装置を用いるときは、1.0U未満であるのがよく、より好ましくは0.05～0.8Uが適当である。トランスグルタミナーゼの量が0.01U未満の場合には、環境負荷の改善効果や、分離蛋白としての蛋白収量の改善効果が充分でなく、100Uを超える場合には反応制御が困難になる。また反応を進めすぎると、次の酸沈・分離工程において、カード中に分離しがたいホエーが残留していわゆるカードのゆるみを招いてしまい、あえてカードからホエーをより排除しようとする、カード成分が一部随伴してホエー側に移り、ホエー中に沈殿性向の強い成分が以降し、かえって環境負荷を増大させ同時に分離蛋白の収率を低下させる。すなわち、工業レベルで行える分離法では、カード固形分がホエーに混入することになり、逆に歩留まりが悪くなる。極端に言えば、トランスグルタミナーゼの反応によってホエーに移行する蛋白をカード側に回収するだけの反応を行えばよい。したがって、トランスグルタミナーゼの量は少ないほど反応を制御しやすいという点でよい。

【0016】

トランスグルタミナーゼの作用温度は20～80℃、好ましくは40～60℃が適当である。温度が20℃未満では酵素反応が遅く、80℃以上では酵素の失活が促進される。

【0017】

トランスグルタミナーゼの作用時間は0.01～120分、好ましくは1～60分が適当である。反応時間が極端に短い場合には、充分な反応効果が得られず、長い場合には脱脂豆乳中に菌の増殖を誘発し、腐敗する恐れがある。

【0018】

トランスグルタミナーゼを脱脂豆乳に作用させる態様は前記の通りであるが、ホエーに移行する蛋白を十分に回収かつ得られる蛋白の物性が向上していることがポイントとなる。電気泳動によるホエー中の40kDa以上の高分子バンドが消失されていることが好ましい。このとき、トランスグルタミナーゼを過剰に反応させると、ホエー中の沈殿する蛋白は回収できるが、得られる脱脂豆乳中の蛋白が過剰重合により物性が逆に低下するので、適当な条件が必要である。

【0019】

本発明のトランスグルタミナーゼ作用により、トランスグルタミナーゼ処理したホエー中の粗蛋白質含量がトランスグルタミナーゼ処理しないホエー中の粗蛋白質含量に比べて0.01～100重量%、好ましくは0.1～20重量%減少することが好ましい。減少する蛋白質量が少ないと歩留まりにほとんど寄与されない。またトランスグルタミナーゼは蛋白質中にリジンやグルタミン残基をもっていれば反応するが、反応を進めすぎるとホエー中の低分子蛋白質まで回収する可能性があり、分離大豆蛋白のゲル形成能低下や風味悪化を招く恐れがある。

【0020】

本発明において、トランスグルタミナーゼを作用させた脱脂豆乳に加える酸は食用であれば鉱酸、有機酸など公知の酸を利用することが出来る。

脱脂豆乳に酸を加えて蛋白を沈殿させ上澄みのホエーと沈殿したカードに分離することが出来る。カードを生じさせるpHは等電点（pH4.5）付近であって、大豆蛋白が沈殿してカードとなる範囲であれば特に限定するものではない。

【0021】

酸沈殿したカードは食用のアルカリを用いて中和することが出来る。中和して得られる大

豆蛋白溶液を必要により加熱殺菌処理し噴霧乾燥など公知の乾燥手段を利用して乾燥して粉末状分離大豆蛋白を得ることが出来る。

【0022】

本発明の方法により、トランスグルタミナーゼ処理して得られる分離大豆蛋白の脱脂大豆に対する収率がトランスグルタミナーゼ処理しないで得られる分離大豆蛋白の脱脂大豆に対する収率に比べて0.01～5%、好ましくは0.01～2%増加していることが重要である。収率が少ないとトランスグルタミナーゼを反応させる意味がなく、多すぎるとホエー中の低分子蛋白まで多く回収することになり、製品の物性低下を招く恐れがある。工業生産において上限の収率に到達している段階において、ほんの1%の収率アップが経済的には大きな生産性の向上につながり、産業上の意義が大きい。

【0023】

【実施例】

以下、実施例により本発明の実施態様を具体的に説明する。

【0024】

〔実施例1および比較例1〕

低変性脱脂大豆100重量部に対して、水1000重量部に添加溶解させた抽出水溶液を添加して40℃、30分間抽出を行った。抽出後、遠心分離でオカラを除き脱脂豆乳（固形分6重量%、内蛋白質4重量%）を得た。ここで、脱脂豆乳の粗蛋白質1gに対して0.5U相当のトランスグルタミナーゼ製剤「TG-Sマイルド」（味の素（株）製）を添加し、50℃・30分反応させた（実施例1）。またトランスグルタミナーゼを反応させなかったものを比較例1とした。これらを塩酸を用いてpH4.5に調整して等電点沈殿させ、遠心分離で酸沈カードを得て、これを加水し水酸化ナトリウムで中和した後、140℃で10秒の加熱後、噴霧乾燥にて各分離大豆蛋白を得た。脱脂大豆100重量部に由来する各カード、ホエー中の粗蛋白質量（重量部）を測定した。

【0025】

【表1】

	酵素量 (粗蛋白質1g当り)	カード中 粗蛋白質量	ホエー中 粗蛋白質量
実施例1	0.5U	37.6	5.1
比較例1	無添加	36.5	6.2

【0026】

表1より脱脂豆乳にトランスグルタミナーゼを作用させることで、ホエー蛋白が減少し、カード中の蛋白量が増加したことにより、歩留が1%以上増加していることがわかる。

【0027】

〔実験例1〕（トランスグルタミナーゼ活性を大きく働かせた場合の比較）

実施例1と同様にして脱脂豆乳を調製し、豆乳の粗蛋白質1gに対して0.5U、1U相当のトランスグルタミナーゼ製剤「TG-Sマイルド」（味の素（株）製）を添加し、50℃で30分反応させた。比較としてはトランスグルタミナーゼを作用させないものを用いた。これらを塩酸を用いてpH4.5に調整して等電点沈殿させ、遠心分離（1300g×5分）で酸沈カードとホエーを得た。そこで得られたカードの水分量を測定することで、いわゆるカードのゆるみ度合いを調べた。

【0028】

【表2】カード水分量（カード全量100当たり）

酵素量 (粗蛋白質1g当り)	カード水分量
無添加	67.09
0.5U	67.95
1U	70.64

【0029】

表2よりトランスグルタミナーゼ活性を働かせるとカードの水分量が増大し、カードのゆるみを招いていることがわかる。これは、生産規模の大きい現場実機による分離では、ホエー側への蛋白の損失が想定される緩みであった。

【0030】

〔実験例2〕（ホエーの電気泳動）

実施例1と同様にして脱脂豆乳を調製し、豆乳の粗蛋白質1gに対して1U相当のトランスグルタミナーゼ製剤「TG-Sマイルド」（味の素（株）製）を添加し、50℃・30分反応させた。比較としてトランスグルタミナーゼを作用させないものを用いた。これらを塩酸を用いてpH4.5に調整して等電点沈殿させ、遠心分離で酸沈カードとホエーを得た。そこでホエーをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、ホエー中の蛋白の挙動を調べた。電気泳動は、Laemmliの方法[Nature, 227巻, 680-685(1970)]によって、2%SDS, 10%β-メルカプトエタノールを含むトリス-HClバッファーにサンプルを溶解させ、0.1%SDSを含有するトリスグリシン(pH8.4)中4~20%グラジェントゲルを使用し、40mAの定流で1時間実施した。泳動後、ゲルをクーマシーブリリアントブルーR250溶液にて染色した。この結果、トランスグルタミナーゼ反応によるホエー蛋白の挙動は、図1に示すとおり、反応により、主に60k付近の蛋白が減少しており（点線の矢印）、ホエー蛋白が減少してカード側へ移行したことが示唆された。

【0031】

〔実験例3〕（抽出工程中におけるトランスグルタミナーゼ処理の影響）

実施例1と同様に脱脂大豆を抽出する際、開始時に実験例2と同じトランスグルタミナーゼ製剤を粗蛋白質1gあたり0.25U、0.5U相当添加し反応させた。比較としてはトランスグルタミナーゼを無添加で抽出したものを用いた。抽出終了後、豆乳スラリーの粘度を測定し、該スラリーを遠心分離機「H-112」（（株）コクサン製）で分離し、得られたオカラの水分量と固形分当りの粗蛋白質量を測定した。

【0032】

【表3】（抽出工程でのトランスグルタミナーゼの影響）

TG添加量 (粗蛋白質1g 当り)	スラリー粘度 (mPa・s)	豆乳スラリー分離後のオカラ	
		水分量 (%)	粗蛋白質 (%)
無添加	76.5	82.5	34.5
0.25U	98.5	83.1	36.0
0.5U	440.0	86.6	43.7

【0033】

表3より、トランスグルタミナーゼの反応を進めると豆乳スラリーの粘度が上昇し、分離後のオカラの水分量は増加、粗蛋白質量も増加し、豆乳スラリーからのオカラ分離能が悪くなることがわかる。

【0034】

【発明の効果】

本発明により原料脱脂大豆から高収率で分離大豆蛋白を製造することが可能になったものであり、従来の限界の壁を越えたものである。

【0035】

【図面の簡単な説明】

【図1】トランスグルタミナーゼ処理したホエーと未処理のホエーの電気泳動パターンである。

【符号の説明】

(a) 未処理

(b) トランスグルタミナーゼ処理

【図1】



